

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 9 日 (09.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/083104 A1

(51) 国際特許分類: C12P 21/00, C12N 15/09

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003508

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 2 日 (02.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-057373 2004 年 3 月 2 日 (02.03.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ゾイジン株式会社 (ZOEGENE CORPORATION) [JP/JP]; 〒2278502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 Kanagawa (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 芳山 美子 (YOSHIYAMA, Yoshiko) [JP/JP]; 〒2278502 神奈川県

横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 ゾイジン株式会社内 Kanagawa (JP). 古賀 裕久 (KOGA, Hirohisa) [JP/JP]; 〒2278502 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 ゾイジン株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 1 0 号 アクロポリス 2 1 ビル 6 階 Tokyo (JP).

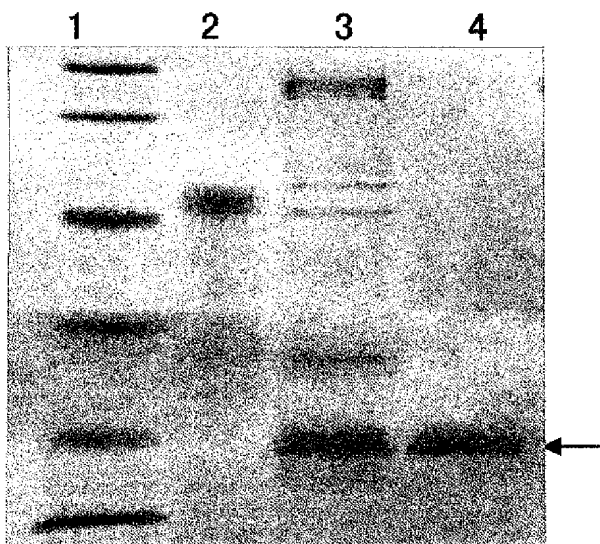
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF PRODUCING LIQUID CELL EXTRACT FOR CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS

(54) 発明の名称: 無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造法



(57) Abstract: A liquid cell extract for cell-free protein synthesis is produced by removing substances capable of binding to an affinity support to be used in purification or interaction analysis from a liquid cell extract having a protein synthesis activity. Then a desired protein is synthesized by using the liquid cell extract for cell-free protein synthesis. The desired protein thus synthesized can be purified by using the affinity support as described above and used in interaction analysis.

(57) 要約: タンパク質合成活性を有する細胞抽出液から、精製や相互作用解析に用いるアフィニティ担体と結合する物質を除去した無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を製造し、該無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いて目的タンパク質を合成する。合成された目的タンパク質は該アフィニティ担体を用いて精製することもできるし、相互作用解析に用いることもできる。

WO 2005/083104 A1



BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

明 細 書

無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造法

技術分野

[0001] 本発明は、無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、該細胞抽出液の製造方法、該細胞抽出液を用いた目的タンパク質合成方法、合成された目的タンパク質の精製方法、並びに合成された目的タンパク質と物質間の相互作用解析方法に関するものである。

背景技術

[0002] タンパク質の合成方法には、生細胞で行う方法と、無細胞タンパク質合成系で行う方法等が知られている。このような合成系で合成されたタンパク質(以下、これを「組換えタンパク質」と称することがある)は、これを適当な方法を用いて精製して利用される。タンパク質の精製方法には、精製するタンパク質の種類によって様々な方法が用いられる。その中で、合成しようとするタンパク質をタグと呼ばれるペプチドとの融合タンパク質として上記の合成系を用いて合成し、該タグペプチドと特異的に結合する物質を固定化したアフィニティ担体により精製する方法が有効に用いられている。

[0003] 組換えタンパク質の利用法として、例えば立体構造解析に用いる場合等は、該タンパク質の精製度は非常に高いものが要求される(タンパク質・酵素の基礎実験法、南江堂、1981年)。また、組換えタンパク質を機能解析に用いる場合には、より精製度の高いものが求められる。しかし、上記のアフィニティ担体を用いたタンパク質の精製方法を行っても、目的タンパク質が高度に精製されることは少なく、さらに複数の精製を組み合わせる必要がある。

[0004] このような複数種類の精製法を組み合わせたタンパク質の精製は、操作が煩雑であるだけでなく、各精製工程における目的タンパク質のロスが増加するために、立体構造解析のように多くのタンパク質量を必要とする目的に用いる場合には問題があった。

そこで、これらの問題を解決するために高度な精製効率を有する精製方法が望まれていた。

[0005] 一方、タンパク質と物質間の相互作用解析を行なう方法が一般に用いられているが、これらの方法で用いられる目的タンパク質溶液に、本来相互作用するものではない非特異的結合をする物質が含まれると、相互作用する物質を保持した担体等と上記タンパク質を接触させて、該物質と結合するタンパク質を取得しようとした場合、擬陽性が多く見られ、解析効率が非常に悪いという問題があった。そこで、これらの問題を解決する高効率なタンパク質－物質間相互作用解析方法が望まれていた。

発明の開示

[0006] 本発明は、高度な精製効率を有するタンパク質の精製や、高効率のタンパク質(ポリペプチド)－物質間相互作用解析方法を提供することを課題とする。さらに詳細には、高度な精製効率を有する精製や高効率なタンパク質－物質間相互作用解析方法に用いるためのタンパク質を合成する無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、該細胞抽出液を用いるタンパク質合成方法、並びに該細胞抽出液により合成されたタンパク質を精製する方法や、該細胞抽出液により合成されたタンパク質を用いてタンパク質－物質間相互作用解析を行なう方法の提供を課題とする。

[0007] 即ち、本発明によれば、

(1) 無細胞タンパク質合成用細胞抽出液製造法であって、タンパク質合成活性を有する細胞抽出液を該抽出液を用いて合成されるタンパク質に親和性を有するアフィニティ担体と接触させて、該細胞抽出液から該アフィニティ担体に結合する物質を除去する工程を含み、該アフィニティ担体は、該細胞抽出液に接触させても該細胞抽出液のタンパク質合成能を損なわないアフィニティ担体であることを特徴とする方法。

(2) 細胞抽出液が、コムギ胚芽抽出液であることを特徴とする(1)の方法。

(3) アフィニティ担体が、(1)または(2)の方法で製造された無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いて合成されるタンパク質が結合し得る物質を担持しているものである(1)または(2)の方法。

(4) アフィニティ担体が、金属キレート担体であることを特徴とする(1)－(3)のいずれかの方法。

(5) 金属キレート担体が、コバルト担体、ニッケル担体、あるいは亜鉛キレート担体

のいずれかである(4)の方法。

(6) (1)ー(5)のいずれかの方法により製造された無細胞タンパク質合成用細胞抽出液。

(7) 無細胞タンパク質合成用細胞抽出液であって、該抽出液を用いて合成されるタンパク質に親和性を有するアフィニティ担体に結合し、該細胞抽出液のタンパク質合成能に大きく影響しない物質が除去されていることを特徴とする細胞抽出液。

(8) (6)または(7)の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いてタンパク質を合成するタンパク質製造方法。

(9) (6)または(7)の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いてタンパク質の合成反応を行い、得られた合成反応液を、該細胞抽出液の製造に用いたアフィニティ担体またはこれと実質的に同一のアフィニティ担体と接触させることにより、タンパク質を該アフィニティ担体に結合させて回収することを特徴とするタンパク質の精製方法。

(10) (6)または(7)の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いてタンパク質の合成反応を行い、得られた合成反応液を、該細胞抽出液の製造に用いたアフィニティ担体またはこれと実質的に同一のアフィニティ担体であって目的物質が担持されたアフィニティ担体と接触させることにより、該タンパク質と該目的物質の相互作用を解析することを特徴とするタンパク質－物質間相互作用解析方法、
等が提供される。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]Talonカラム処理を行ったコムギ胚芽抽出液と未処理のコムギ胚芽抽出液を用いてタンパク質合成反応を行ったときの目的タンパク質合成量を示す電気泳動写真である。図中、レーン1はマーカーを示し、レーン2はコントロールのクレアチンキナーゼ、レーン3は未処理コムギ胚芽抽出液を用いてN-His-JSP-1を合成した反応液、レーン4はTalonカラム処理コムギ胚芽抽出液を用いてN-His-JSP-1を合成した反応液、レーン5は未処理コムギ胚芽抽出液を用いてGFPを合成した反応液、レーン6はTalonカラム処理コムギ胚芽抽出液を用いてGFPを合成した反応液の結果を示す。Talonカラムで処理を行ったコムギ胚芽抽出液のタンパク質合成能は、未処

理のコムギ胚芽抽出液と比べてほぼ同等である。

[図2]Talonカラム処理を行ったコムギ胚芽抽出液と未処理のコムギ胚芽抽出液を用いてタンパク質合成反応を行った後に、同じTalonカラムで精製を行ったタンパク質を示す電気泳動写真である。図中、レーン1は分子量マーカー、レーン2はコントロールのクレアチンキナーゼ、レーン3は未処理コムギ胚芽抽出液を用いてN-His-JSP-1合成を行った後に、同じ金属キレート担体を用いて上記タンパク質の精製を行った結果を示し、レーン4はTalonカラム処理コムギ胚芽抽出液を用いてN-His-JSP-1合成を行った後に、同じ金属キレート担体を用いて上記タンパク質の精製を行った結果を示す。Talonカラムで処理を行ったコムギ胚芽抽出液を用いて合成したタンパク質を同じ担体カラムで精製した場合、未処理の場合に比べて目的タンパク質の精製効率が非常に高いことがわかる。

[図3]Ni-NTAカラム処理を行ったコムギ胚芽抽出液と未処理のコムギ胚芽抽出液を用いてタンパク質合成反応を行った後に、同じNi-NTAカラムで精製を行ったタンパク質を示す電気泳動写真である。図中、レーン1は未処理抽出液を用いてPK65の合成を行った後に、Ni-NTAカラムを用いて精製を行った結果を示し、レーン2はNi-NTAカラム処理抽出液を用いてPK65の合成を行った後に、同じNi-NTAカラムを用いて精製を行った結果を示し、レーン3は未処理抽出液を用いてPK142の合成を行った後に、同じNi-NTAカラムを用いて精製を行った結果を示し、さらにレーン4はNi-NTA処理抽出液を用いてPK142の合成を行った後に、同じNi-NTAカラムを用いて精製を行った結果を示す。Ni-NTAカラム処理抽出液を用いて合成したタンパク質をNi-NTAカラムで精製した結果では、溶離液中の目的のタンパク質の純度が高くなっており、未処理抽出液を用いて合成したタンパク質をNi-NTAカラムで精製した結果では、目的のタンパク質以外にコムギ胚芽抽出液由来のタンパク質が高濃度溶離液中に含まれていることがわかる。つまり、Ni-NTAカラム処理抽出液を用いて合成したタンパク質をNi-NTAカラムで精製することにより、目的タンパク質の非常に高度な精製が可能であることが確認される。

発明を実施するための最良の形態

[0009] 以下、本発明を実施するための最良の形態について詳細に説明する。以下に記載

する構成要件の説明は、本発明の実施態様の一例(代表例)であり、これらの内容に特定はされない。

[0010] (1) 無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造

本発明の1つは、無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造法であって、タンパク質合成活性を有する細胞抽出液を該抽出液を用いて合成されるタンパク質に親和性を有するアフィニティ担体と接触させて、該細胞抽出液から該アフィニティ担体に結合する物質を除去する工程を含み、該アフィニティ担体は、該細胞抽出液に接触させても該細胞抽出液のタンパク質合成能を損なわないアフィニティ担体であることを特徴とする方法である。「タンパク質合成活性を有する細胞抽出液」とは、鋳型核酸、アミノ酸、エネルギー源等を供給することにより無細胞タンパク質合成を行うことができる細胞抽出液を意味し、このような活性があれば何れのものでもよい(以下、これを「細胞抽出液」と称することがある)。具体的には、大腸菌、植物種子の胚芽、ウサギ網状赤血球等の細胞抽出液等が挙げられる。これら無細胞タンパク質合成用細胞抽出液は、市販のものも用いることができるし、それ自体既知の方法、例えば、大腸菌の場合は、Pratt, J. M. et al., Transcription and translation, Hames, 179-209, B. D. & Higgins, S. J., IRL Press, Oxford(1984)等に記載の方法を用いて作製したものでよい。

[0011] 市販の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液としては、大腸菌由来のものは、E. coli S30 extract system(Promega社製)とRTS 500 Rapid Translation System等を用いることができ、ウサギ網状赤血球由来のものは、Rabbit Reticulocyte Lysate system (Promega社製)等、さらにコムギ胚芽由来のものは、PROTEIOSTM(TOYOBO社製)等を用いることができる。

このうち、コムギ胚芽細胞抽出液を用いて合成された目的タンパク質の精製に金属キレート担体を用いる場合には、コムギ胚芽細胞抽出液に金属キレート担体に結合する物質が多く含まれるため、本発明の方法により製造された無細胞タンパク質合成用コムギ胚芽細胞抽出液を用いることが好ましい。

[0012] 本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造法において原料として用いることのできるコムギ胚芽細胞抽出液としては、WO03/064671号公報に記載の方

法により調製された細胞抽出液等が特に好ましく用いられる。

より、具体的にはコムギ胚芽細胞抽出液は以下のようにして調製することができる。

コムギ種子から無傷の胚芽を主成分とする胚芽画分を取得する。ここで、無傷の胚芽とは、少なくとも発芽能を有する胚芽を意味し、胚芽画分とは、無傷の胚芽を主要成分とするものであり、これを用いて無細胞タンパク質合成に使用しうる細胞抽出物が調製可能なものを意味する。コムギ種子に含まれる胚芽の量は少なく、種子から胚芽を効率的に取得するためには、胚芽以外の部分をできるだけ除去しておくことが好ましい。通常、まず、コムギ種子に機械的な力を加えることにより、胚芽、胚乳破碎物、種皮破碎物を含む混合物を得、該混合物から、胚乳破碎物、種皮破碎物等を取り除いて粗胚芽画分(胚芽を主成分とし、胚乳破碎物、種皮破碎物を含む混合物)を得る。コムギ種子に加える力は、コムギ種子から胚芽を分離することができる程度の強さであればよい。

通常は、公知の粉碎装置を用いて、コムギ種子を粉碎することにより、胚芽、胚乳破碎物、種皮破碎物を含む混合物を得る。コムギ種子の粉碎は、通常公知の粉碎装置を用いて行うことができるが、ピンミル、ハンマーミル等の被粉碎物に対して衝撃力を加えるタイプの粉碎装置を用いることが好ましい。粉碎の程度は、使用するコムギ種子胚芽の大きさに応じて適宜選択すればよい。コムギ種子の場合は、通常、最大長さ4mm以下、好ましくは最大長さ2mm以下の大きさに粉碎する。また、粉碎は乾式で行うのが好ましい。

次いで、得られたコムギ種子粉碎物から、通常公知の分級装置、例えば篩を用いて粗胚芽画分を取得する。コムギ種子の場合、通常、メッシュサイズ0.5mm〜2.0mm、好ましくは0.7mm〜1.4mmの粗胚芽画分を取得する。さらに、必要に応じて、得られた粗胚芽画分に含まれる種皮、胚乳、ゴミ等を風力、静電気力を利用して除去してもよい。

また、胚芽と種皮、胚乳の比重の違いを利用する方法、例えば重液選別により、粗胚芽画分を得ることもできる。より多くの胚芽を含有する粗胚芽画分を得るために、上記の方法を複数組み合わせてもよい。胚芽は、胚芽以外の部分よりも硬いために、上記粉碎処理の際も胚芽以外の部分は粉碎されるが、胚芽は粉碎されずその形状

を保ったまま分離される。

- [0013] 上記のようにして得られた胚芽、胚乳破碎物、種皮破碎物等を含む粗胚芽画分から、目視等により形状の違いに基づいて胚芽を選別する。種子粉碎物から胚芽を選別することもできるが、種子粉碎物は胚芽以外の成分を大量含んでいるため、効率的ではない。このようにして得られた胚芽画分には、胚乳成分が付着している場合があるため、通常、胚芽純化のために更に洗浄処理することが好ましい。

洗浄処理としては、通常10℃以下、好ましくは4℃以下に冷却した水又は水溶液に胚芽画分を分散・懸濁させ、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄することが好ましい。また、通常10℃以下、好ましくは4℃以下で、界面活性剤を含有する水溶液に胚芽画分を分散・懸濁させて、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄することがより好ましい。界面活性剤としては、非イオン性のものが好ましく、非イオン性界面活性剤であるかぎり、広く利用ができる。具体的には、例えば、好適なものとして、ポリオキシエチレン誘導体であるブリッジ(Brij)、トリトン(Triton)、ノニデット(Nonidet) P40、ツイーン(Tween)等が例示される。なかでも、ノニデット(Nonidet) P40が最適である。これらの非イオン性界面活性剤は、例えば0.5%の濃度で 사용할 ことができる。水又は水溶液による洗浄処理及び界面活性剤による洗浄処理は、どちらか一方でもよいし、両方実施してもよい。また、これらの洗浄処理は、超音波処理との組み合わせで実施してもよい。

- [0014] かくして、胚乳成分が除去された胚芽画分を取得することができる。胚芽画分中に胚乳成分が含まれていないことは、リボソームがトリチンによって実質的に脱アデニン化されないことから確認できる。

以上のようにして得られた胚芽を、微粉碎及び抽出処理することにより胚芽抽出物を得る。胚芽抽出物を得る方法は、従来公知の方法で行うことができる。例えば、液体窒素で凍結した胚芽を乳鉢等を用いて微粉碎し、抽出溶媒を加えて攪拌した後、胚芽抽出物含有液を遠心分離等により回収し、ゲルろ過等により精製する。あるいは、胚芽を衝撃または切断により粉碎し、抽出溶媒を加えて攪拌した後、胚芽抽出物含有液を遠心分離により回収し、ゲルろ過等により精製する。

抽出溶媒としては、緩衝液、カリウムイオン、マグネシウムイオン及び／又はチオー

ル基の酸化防止剤を含む水溶液を用いることができる。また、必要に応じて、カルシウムイオン、L型アミノ酸等をさらに添加してもよい。例えば、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)-KOH、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、L型アミノ酸及び／又はジチオスレイトールを含む溶液や、Pattersonらの方法を一部改変した溶液(HEPES-KOH、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、塩化カルシウム、L型アミノ酸及び／又はジチオスレイトールを含む溶液)を抽出溶媒として使用することができる。抽出溶媒中の各成分の組成・濃度はそれ自体既知であり、無細胞タンパク質合成用のコムギ胚芽抽出液の製造法に用いられるものを採用すればよい。

ゲルろ過としては、例えば予め抽出溶媒(HEPES-KOH、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、ジチオスレイトール又はL型アミノ酸を含む溶媒)で平衡化しておいたゲルろ過装置を用いて行うことができる。ゲルろ過溶液中の各成分の組成・濃度はそれ自体既知であり、無細胞タンパク質合成用のコムギ胚芽抽出液の製造法に用いられるものを採用すればよい。

[0015] 本発明において、「アフィニティ担体」とは、特定のタンパク質と親和性を有し、これらと結合し、これらを吸着する性質を有する物質を保持した担体を意味する。該アフィニティ担体は、特定のタンパク質と結合し、これを吸着することによって、特定のタンパク質、または該タンパク質を介した他タンパク質の精製に用いられ得るものである。また、特定タンパク質と物質間の相互作用の解析に用いられるものとしては、特定タンパク質と相互作用する物質を保持したアフィニティ担体を用いる。本発明の方法では、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いて合成されるタンパク質に親和性を有するアフィニティ担体を用いる。

本発明の方法において、細胞抽出液から除去する「アフィニティ担体に結合する物質」とは、アフィニティ担体に接触させる前の細胞抽出液に含まれる物質であって、上記アフィニティ担体に結合し、タンパク質合成活性を有する細胞抽出液から該物質を除去しても細胞抽出液のタンパク質合成能が損なわれずに保持されるものであれば何れのものでもよい。また、該細胞抽出液の「タンパク質合成能が保持される」とは、該細胞抽出液のタンパク質合成能が、合成される目的タンパク質の利用に十分な量

を合成し得る程度に保たれることを意味する。具体的には、未処理の同じ細胞抽出液と比較してそのタンパク質合成能が30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上に保たれるものを意味する。これらには、タンパク質合成活能が未処理の細胞抽出液と比較して上昇するものも含まれる。例えば、タンパク質合成能は、SDS-PAGEなどの電気泳動により合成されたタンパク質のバンドの濃さを比較することや、合成反応系に標識アミノ酸を加え、合成タンパク質への標識アミノ酸の取り込み量を比較することによって調べることができる。

[0016] アフィニティ担体として、一般的にタンパク質の精製に用いられるものの具体例としては、コバルト担体、ニッケル担体等の金属キレート担体、HiTrap chelating HP (アマシャム社製)、IPAC Metal Chelating Resin (エプロジェン社製)等の金属キレート用担体とニッケルイオン、コバルトイオン、亜鉛イオンなどの金属イオンの組み合わせによる金属キレート担体、抗体結合担体、マルトース結合担体、グルタチオン結合担体、メトリキセート結合担体、ProteinG結合担体、ProteinA結合担体、抗体のFc部位結合担体、4-aminophenylarsine oxide結合担体、セルロース結合担体等が挙げられる。また、抗体結合担体としては、例えば、抗HA抗体結合担体、抗FLAG抗体結合担体、抗mycタグ抗体結合担体、抗T7抗体結合担体、抗V5抗体結合担体、抗チオレドキシン抗体結合担体、抗CAT抗体結合担体、抗GFP抗体結合担体、抗 β -gal抗体結合担体等が挙げられる。

[0017] 上記の細胞抽出液およびアフィニティ担体として、好ましい組み合わせは、コムギ胚芽抽出液と金属キレート担体、あるいはコムギ胚芽抽出液とグルタチオン結合担体等が挙げられる。金属キレート担体として好ましくは、コバルト担体、ニッケル担体などが挙げられる。さらに具体的には、コバルト担体としてはTalon Metal Affinity Resin (クローンテック社、BD Bioscience社)等が挙げられ、ニッケル担体としては、Ni-NTA-Agarose (キアゲン社製)、Ni-Sepharose (アマシャム社製)等が挙げられる。

[0018] また、タンパク質と物質間の相互作用の解析に用いるものとしては、特定のタンパク質に結合する物質、例えば医薬活性化合物、酵素阻害物質、ATPアナログ、核酸、タンパク質、ポリペプチド等を保持した担体が挙げられる。

アフィニティ担体を構成し、タンパク質と親和性を有する物質が保持される担体は、本発明の細胞抽出液製造方法や、タンパク質の精製、あるいはタンパク質－物質間相互作用解析などに用いられるものであれば如何なるものであってもよい。具体的には、アガロース、セルロース、セファロースや、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリアクリレート、テフロン、ポリアセタール等を用いた、ボール又はビーズ、ギヤ、マイクロプレート等が好ましく使用される。固定化の方法は公知の方法を採用できる。

[0019] 本発明の方法で用いられるアフィニティ担体の選択は、アフィニティ担体を細胞抽出液に接触させて細胞抽出液から該アフィニティ担体に結合する物質を除去しても、細胞抽出液のタンパク質合成能が損なわれずに保持されていることを指標として行なうことができる。具体的には、例えば、下述する方法でアフィニティ担体と細胞抽出液を接触させた(以下、この操作を「吸着」と称することがある)後、下述する方法で該細胞抽出液を用いて目的タンパク質を合成する。ここで、合成された目的タンパク質の量を、未処理の細胞抽出液で合成した目的タンパク質の量と適当な方法で比較し、未処理の細胞抽出液で合成したものと比較して30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上の合成量を示すものを選択する方法が挙げられる。

[0020] 本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液製造法は、上記細胞抽出液を上記アフィニティ担体と接触させる工程を含むことを特徴としている。「細胞抽出液とアフィニティ担体を接触させる方法」は、アフィニティ担体や細胞抽出液の種類に応じて適宜選択することができる。ただし、該アフィニティ担体を用いて本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液により合成されたタンパク質を精製又は相互作用解析する条件と同じ条件で接触させることが好ましい。但し、上記細胞抽出液のタンパク質合成能が保持されるように行うことは重要である。また、接触させるアフィニティ担体と細胞抽出液の体積量は、これらの種類によって適宜選択し得るが、細胞抽出液に対して1/100以上の体積量のアフィニティ担体を用いることが好ましく、さらに好ましくは1/10〜10倍の体積量、最も好ましくは1/5〜2倍の体積量のアフィニティ担体を用いることが好ましい。

[0021] 具体的な細胞抽出液とアフィニティ担体との接触法は、アフィニティ担体と細胞抽出液を適当な容器中で混合するバッチ法、あるいはアフィニティ担体を適当なカラム

に詰めた後に、細胞抽出液を該カラムに添加するカラム法等が挙げられる。カラム法を用いる場合、アフィニティ担体は、予め適当な緩衝液で平衡化しておくことが好ましい。適当な緩衝液とは、用いるアフィニティ担体の種類によって適宜選択されるが、細胞抽出液を添加する前には、該細胞抽出液と同様の緩衝液に交換しておくことが好ましい。

[0022] 接触させる温度は、細胞抽出液中のアフィニティ担体に結合すべき物質が結合できて、かつ細胞抽出液のタンパク質合成能が保持される範囲であればよい。具体的には、例えば、0〜50℃が好ましく、さらには2〜30℃が好ましい。特に細胞抽出液としてコムギ胚芽抽出液を用いる場合、好ましくは4〜26℃で接触させることが好ましい。接触させる時間は、細胞抽出液中のアフィニティ担体に結合すべき物質が結合できて、細胞抽出液のタンパク質合成活性が低下しない範囲であればよく、具体的には、例えば、1分以上、好ましくは5〜100分、さらに好ましくは10〜60分である。

[0023] 金属キレート担体を用いる場合には、細胞抽出液中に含まれる還元剤、特にジチオスレイトールの濃度によっては、金属が担体から遊離することがあるが、遊離した金属が、タンパク質合成活性に著しく影響しない限り用いることができる。また、還元剤の濃度を調節したり、他の還元剤を用いること等によってこの金属の遊離を阻害することは有効である。また、金属キレート担体と細胞抽出液を接触させる際に、イミダゾールなどのイミダゾール環を有する化合物またはその誘導体(以下、これを「イミダゾール類」と称することがある)を添加することによれば、上記金属キレート担体に、弱く非特異的に結合している物質の吸着が抑えられるため、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液のタンパク質合成能を保持するために有効である。イミダゾール類の具体的な濃度としては、1mM以上、好ましくは2〜50mM、さらに好ましくは10〜20mMが挙げられる。

[0024] また、細胞抽出液とアフィニティ担体との接触は、公知の細胞抽出液の製造工程の全部を経た後に行ってもよく、また、細胞からタンパク質合成活性を有する抽出液が抽出された後の何れの工程で行ってもよい。

[0025] かくして製造された本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液も本発明の範囲に含まれる。本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液は、特定のタンパク質に

親和性を有するアフィニティ担体に結合し、該細胞抽出液のタンパク質合成能に大きく影響しない物質が除去されている特徴を有する。

本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液にタンパク質合成に必要な翻訳鋳型、核酸分解酵素阻害剤、各種イオン、基質、エネルギー源等(以下、これを「翻訳反応用添加物」と称することがある)を添加して目的タンパク質合成用システム(キット)に付することによりタンパク質合成を行うことができる。また、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を適当な装置を用いて濃縮した後に、目的タンパク質合成に用いることもできる。本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液は、これを凍結させて保存することもできるし、翻訳鋳型及び核酸分解阻害剤以外の翻訳反応用添加物を添加した液(本明細書中ではこれを「レディメイド型細胞抽出液」と称することがある)として保存することもできる。また、特開2000-316594号公報、あるいは特開2002-125693号公報等に記載の方法等を用いて凍結乾燥して保存することもできる。「細胞抽出液のタンパク質合成能に大きく影響しない」とは、該物質を細胞抽出液から除去した時に、未処理の細胞抽出液と比較して、そのタンパク質合成能が30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上であることを意味する。

[0026] (2) 目的タンパク質の合成

上記(1)に記載の方法で製造した無細胞タンパク質合成用細胞抽出液は、上記の翻訳反応用添加物を添加して目的タンパク質合成用システムに付することによりタンパク質合成を行うことができる。翻訳反応用添加物は、用いる無細胞タンパク質合成用細胞抽出液によって異なるが、公知のものを適宜選択して用いることができる。

具体的には、例えば、コムギ胚芽抽出液を用いる場合、翻訳反応溶液としては、鋳型となる核酸、基質となるアミノ酸、エネルギー源、各種イオン、緩衝液、ATP再生系、核酸分解酵素阻害剤、tRNA、還元剤、ポリエチレングリコール、3', 5'-cAMP、葉酸塩、抗菌剤等が含まれる。それぞれ濃度としては、ATPとしては100 μ M-0.5mM、GTPは25 μ M-1mM、20種類のアミノ酸としてはそれぞれ25 μ M-0.4mM含まれるように添加することが好ましい。ここで、細胞抽出液としてWO03/064671号公報に記載の方法により調製されたコムギ胚芽抽出液を用いる場合には、通常tRNAの添加は必要無い。

[0027] タンパク質合成のための方法、または装置も、それぞれ選択した無細胞タンパク質合成用細胞抽出液に適した公知の方法や装置を選択することができる。コムギ胚芽抽出液を用いる場合には、バッチ法(Pratt,J.M.et al.,Transcription and Translation,Hames,179-209,B.D.&Higgins,S.J.,eds,IRL Press,Oxford(1984))のように、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液に無細胞タンパク質合成に必要なエネルギー源やアミノ酸、あるいはtRNAを添加して行う方法や、アミノ酸、エネルギー源等を連続的に反応系に供給する連続式無細胞タンパク質合成システム(Spirin,A.S.et al.,Science,242,1162-1164(1988))、透析法(木川等、第21回日本分子生物学会、WID6)、あるいは重層法(Sawasaki, T., et al., FEBS Let. ,514, 102-105(2002))等が挙げられる。さらには、合成反応系に、鋳型のRNA、アミノ酸、エネルギー源等を必要時に供給し、合成物や分解物を必要時に排出する不連続ゲルろ過法(特開2000-333673号公報)等を用いることができる。また、無細胞タンパク質合成に必要なアミノ酸、エネルギー源等を含むゾルまたはゲルの上部に翻訳反応液を重層して行う方法(国際公開2004/050891号パンフレット)を用いることもできる。

[0028] 鋳型となる核酸は、目的タンパク質をコードするものを用いる。目的タンパク質は、本発明の細胞抽出液で合成され得るものであれば如何なるものであってもよいが、本発明の細胞抽出液を用いる効果は、目的タンパク質の精製や、目的タンパク質-物質間の相互作用解析を行なう場合に発揮されるので、アフィニティ担体に保持されている物質と親和性を有し、これと結合する性質を有する可能性のあるタンパク質が好ましい。目的タンパク質の精製を行なう場合には、アフィニティ担体に保持されている物質と結合することが必要である。ここで、目的タンパク質が本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造あるいは後述する目的タンパク質の精製に用いるアフィニティ担体に結合しない場合には、これと結合する能力のあるペプチド(以下、これを「タグ」と称することがある)との融合タンパク質をコードするものを用いることができる。

具体的には、目的タンパク質をコードする塩基配列、または目的タンパク質とタグとの融合タンパク質をコードする塩基配列(以下、これを「ORF」と称することがある)を

有し、ORFの上流に、プロモーター配列、翻訳活性増強配列等の転写翻訳制御領域を有し、下流には停止配列とmRNAの安定性のための非翻訳領域を含むことが好ましい。プロモーター配列は、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液、または転写に用いるRNA合成酵素により適宜選択することができる。具体的には、転写にSP6 RNA合成酵素を用いる場合には、SP6プロモーターを用いることが好ましい。翻訳活性増強配列として具体的には、真核生物においては、5'キャップ構造(Shatkin, Cell, 9, 645-(1976))、コザック配列(Kizak, Nucleic Acid. Res., 12, 857-(1984))等があり、また原核生物においてはシャインダルガーノ配列等が知られている。更にはRNAウィルスの5'-非翻訳リーダー配列にも翻訳促進活性があることが見出されており(特許第2814433号公報)、これらの配列を用いてタンパク質合成を効率よく行う方法が開発されている(特開平10-146197号公報)。

[0029] 目的タンパク質は、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いた上記合成法により合成され得るものであれば如何なるものであってもよい。目的タンパク質としてタグとの融合タンパク質を用いる場合、タグは、上記アフィニティ担体に特定に結合する性質を有するものを用いる。本発明で用いられるアフィニティ担体と、これと特異的に結合するタグとの組み合わせは、例えば、金属キレート担体とポリヒスチジン、マルトース結合担体とマルトース結合タンパク質、グルタチオン結合担体とグルタチオン-Sトランスフェラーゼ(GST)、メトリキセート結合担体とジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)、ProteinG結合担体、あるいはProteinA結合担体と抗体のFc部分、抗体のFc部位結合担体とProteinG、あるいはProteinA、4-aminophenylarsine oxide結合担体とチオレドキシン、セルロース結合担体とセルロースバインディング部位、抗HA抗体結合担体とHAタグ、抗FLAG抗体結合担体とFLAGタグ、抗myc抗体結合担体とmycタグ、抗T7抗体結合担体とT7タグ、抗V5抗体結合担体とV5タグ、抗チオレドキシン抗体結合担体とチオレドキシン、抗CAT抗体結合担体とCATタグ、抗GFP抗体結合担体とGFP等が挙げられる。

[0030] これらのタグは、目的タンパク質のどこに含まれていてもよいが、好ましくは、目的タンパク質のN末またはC末に位置するものが挙げられる。本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造および目的タンパク質の精製等に、上記(1)に挙げた抗

体結合担体を用いる場合には、その抗体に対する抗原ポリペプチドと目的タンパク質との融合タンパク質を用いることができる。ここで、該抗体結合担体の抗原が目的タンパク質自身である場合は、目的タンパク質そのものを用いることができる。タグとして用いる抗原ポリペプチドは、担体に結合している抗体に結合し得る限り、その構造は特に制限はない。

[0031] また、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の製造および目的タンパク質の精製にアビジン結合担体やストレプトアビジン結合担体を用いる場合には、目的タンパク質がビオチン修飾されたタンパク質が合成されるような合成方法を用いる。具体的には、例えば、目的タンパク質をコードする鋳型を用い、ビオチン修飾されたアミノ酸を含む上記のタンパク質合成方法等が挙げられる。

[0032] また、必要であれば、アフィニティ担体による目的タンパク質の精製後に、タグを目的タンパク質から分離するための構造を有する鋳型を用いることができる。具体的には、プロテアーゼ認識配列がタグと目的タンパク質との間に挿入されたタンパク質をコードする鋳型を用いることができる。プロテアーゼ認識配列とは、具体的には、例えば、PreScissionTMProtease (アマシャムバイオサイエンス社) 認識配列等が挙げられる。

また、本発明の細胞抽出液を用いて合成したタンパク質を、タンパク質-物質間相互作用解析に用いる場合には、合成されるタンパク質は相互作用解析に適した形態を有するように合成されることが好ましい。具体的には、例えば、タンパク質(ポリペプチド)とそれをコードする核酸が共有結合した形態を有する分子等が挙げられる。この分子の合成法や、これを用いたタンパク質-物質間相互作用解析方法等は、例えば、WO98/16636号公報等に記載された方法を用いることができる。

[0033] (3) 目的タンパク質の精製

上記(2)のようにして得られるタンパク質合成反応溶液を、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を製造する際に用いたアフィニティ担体またはこれと実質的に同一のアフィニティ担体と接触させ、アフィニティ担体に結合したタンパク質を溶離することにより、目的タンパク質を高度に精製することができる。「実質的に同一なアフィニティ担体」とは、本発明の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を製造する際に用

いたアフィニティ担体と同様の物質を結合し、合成されたタンパク質を吸着する性質を有するものであれば十分であり、全く同一のものでなくてもよいことを意味する。アフィニティ担体を用いる目的タンパク質の精製は、それ自体既知の各アフィニティ担体に適した方法を用いることができる。ここで、アフィニティ担体の平衡化用緩衝液および溶離用緩衝液に、5〜20mMのイミダゾール等のイミダゾール環を有する化合物あるいはその誘導体を添加することによれば、アフィニティ担体への非特異的吸着を防止することができ、目的タンパク質の精製効率をさらに上昇させることができる。

[0034] 上記アフィニティ担体に吸着後、適当な方法で溶離された目的タンパク質は、例えば、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動などを用いて分離し、CBB染色などにより確認することができる。

[0035] (4) 目的物質とタンパク質の相互作用解析

また、本発明の細胞抽出液を用いて合成したタンパク質は、タンパク質—物質間相互作用解析に用いることもできる。例えば、アフィニティ担体として、タンパク質に結合しうる目的物質を担持させた担体を用い、これに本発明の細胞抽出液を用いて合成したタンパク質を接触させて、該タンパク質と該目的物質の相互作用を解析することができる。この場合、1種類のタンパク質を合成し、そのタンパク質と担体に担持された目的物質の相互作用を解析することもできるし、タンパク質ライブラリーのような複数のタンパク質を合成し、それらのタンパク質の中から目的物質と相互作用するタンパク質を探索することもできる。相互作用の解析法は特に制限されないが、例えば、標識されたタンパク質を合成し、担体に特異的に結合した標識物質の量に基づいて解析してもよい。また、上述したようなタンパク質(ポリペプチド)とそれをコードする核酸が共有結合した形態を有する分子を用いてもよい。この場合、目的物質に結合したタンパク質を容易に同定することができるため、目的物質と相互作用するタンパク質を探索するような研究に適している。

実施例

[0036] 以下に、実施例を挙げ本発明をさらに具体的に説明する。以下の実施例は本発明の一例を示すものに過ぎず、本発明の範囲は以下の実施例により何ら限定されるものではない。

なお、以下の実施例において、minは分、lはリットル、mlはミリリットル、Mはモル／リットル、mMはミリモル／リットル、 μ gはマイクログラムをそれぞれ表す。

[0037] 実施例1 ワーリングブレンダーによる微粉碎抽出

北海道産のチホク小麦(未消毒)を用い、WO02/295377号公報の実施例に記載の方法に準じて、胚芽を分離し、胚芽の純度(任意のサンプル1gあたりに含まれる胚芽の重量割合)が98%以上になるまで選別した。得られた小麦胚芽50gを、4℃の蒸留水中に懸濁し、超音波洗浄器を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄した。次に、ノニデット(Nonidet)P40の0.5容量%溶液に懸濁し、超音波洗浄器を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄して胚乳分を除去した小麦胚芽を得た。

次いで、以下の操作を4℃で行い、小麦胚芽抽出液を得た。まず洗浄した小麦胚芽を抽出Buffer(HEPES-KOH(pH7.8)80mM、酢酸カリウム200mM、酢酸マグネシウム10mM、塩化カルシウム4mM、L型アミノ酸20種類各0.6mM及びジチオスレイトール8mM)100mlとともにワーリングブレンダーに入れ、回転数5000〜20000rpmで30秒粉碎した。ブレンダー内壁に付着した胚芽等をかき落とした後、再び5000〜20000rpmで30秒粉碎する作業を2回行った。得られた胚芽粉碎物の粒径分布をレーザー散乱方式粒度分布装置(堀場製作所製LA-920)を用いて測定した。

[0038] 得られた抽出液と粉碎胚芽の混合物を遠心管に移し30000g、30分間の遠心をかけ上清を採取した。これをさらに30000g、30分間の遠心をかけ上清を採取する操作を5回繰り返し、濁りのない上清を得た。これを、あらかじめBuffer(HEPES-KOH(pH7.8)40mM、酢酸カリウム100mM、酢酸マグネシウム5mM、L型アミノ酸20種類各0.3mM、及びジチオスレイトール4mM)で平衡化しておいたセファデックスG-25カラムでゲルろ過を行った。得られた液を30000g、12分間の遠心をかけ上清を採取し、限外ろ過膜を使用して濃縮を行った。これを小麦胚芽抽出液とした。試料の濃度は、260nmにおける光学密度(O. D.) (A_{260}) が180〜250 ($A_{260}/A_{280} = 1.5$ 程度)になるように調製した(以下、これを「未処理抽出液」と称することがある)。

[0039] 実施例2 Talon Metal Affinity Resinカラムによるコムギ胚芽抽出液処理

(1) Talon Metal Affinity Resinカラムの平衡化

金属キレート担体カラムであるTalon Metal Affinity Resin50%溶液(クローンテック、BD Biosciences社製):100 μ lをスピнкаラムに添加して、3000rpm、1min、4°Cで遠心分離し、カラム担体に含まれる保存Bufferを除去した。次に、保存Bufferを除去した担体にコムギ胚芽抽出液を作製する際に使用したBuffer(HEPES-KOH(pH7.8)40mM、酢酸カリウム100mM、酢酸マグネシウム5mM、L型アミノ酸20種類各0.3mM及びジチオスレイトール4mM):500 μ lを添加して、3000rpm、1min、4°Cで遠心分離し、Bufferを除去した。これを3回繰り返し、担体の平衡化を行った。

[0040] (2)カラムによるコムギ胚芽抽出液処理

上記(1)で平衡化を行ったカラム担体に対して実施例1で作製したコムギ胚芽抽出液:50 μ lを添加し、26°C、30minインキュベートし、コムギ胚芽抽出液の内在性のTalon Metal Affinity Resinに吸着するタンパク質の吸着を行った。その後、3000rpm、1min、4°Cで遠心分離し、内在性のTalon Metal Affinity Resinに吸着するタンパク質を除去したコムギ胚芽抽出液(以下、これを「Talonカラム処理抽出液」と称することがある)を作製した。

[0041] (3)Talonカラム処理抽出液と未処理抽出液の液組成調整

上記の条件で処理を行ったTalonカラム処理抽出液と実施例1で作製した未処理抽出液の液組成を最終濃度 30mM HEPES-KOH, pH7.8、100mM酢酸カリウム、2.65mM酢酸マグネシウム、2.5mMジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mMクレアチンリン酸、0.4mg/mlクレアチンキナーゼ、0.380mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸(各0.3mM)になるように調整した。その後、液組成を調整したコムギ胚芽抽出液を260nmでの吸光度が75AbsになるようにBuffer(30mM HEPES-KOH, pH7.8、100mM酢酸カリウム、2.65mM酢酸マグネシウム、2.5mMジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mMクレアチンリン酸、0.4mg/mlクレアチンキナーゼ、0.380mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸(各0.3mM))を用いて調節した。

[0042] 実施例3 Talonカラム処理抽出液と未処理抽出液のタンパク質合成能の比較

実施例2で調整した2種類のコムギ胚芽抽出液40 μ lに対して(i)GFP遺伝子をコ

ードするmRNAと(ii) アミノ基末端側にヒスチジン10個の遺伝子配列とその下流にPreScissionTMProtease(アマシャム バイオサイエンス社)認識配列とその下流にJSP-1構造遺伝子の1番目のメチオニンから163番目のグルタミン酸までの遺伝子をコードするmRNAの2種類を用いてタンパク質合成を行った。

[0043] (1) 鋳型の調製

(i) N-His-JSP-1 (1-163) / pEU

SP6プロモーター配列およびリボソーム結合配列を5'→3'の順に含むオリゴDNA(配列番号1)を化学合成により取得した。また、JSP-1 (GenBank Accession No.AF424702)を鋳型として、5'センス側のプライマーとして、ヒスチジントグをコードする配列とPreScissionTMProtease(アマシャム バイオサイエンス社)認識配列、さらにその下流にJSP-1の5'端の配列を含むオリゴDNA(配列番号2)用い、3'アンチセンス側プライマーとして、5'末端にSfiIサイトを付加したJSP-1の163番目のグルタミン酸までを増幅することができるオリゴDNA(配列番号3)を用いてPCRによりDNA断片を増幅した。得られたDNA断片をSfiIで切断した(以下、これを「JSP-1断片」と称することがある)。

[0044] タンパク質合成用ベクターであるpEU3b(Sawasaki, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99(23), 14652-14657(2002))からSP6プロモーター配列、Ω配列およびマルチクローニングサイトを除去して、NaeIおよびSfiIサイトを付加した。このベクターをNaeIで切断し、上記で取得した配列番号1で示されるDNA断片とライゲーションを行った。このプラスミドをpEUbluntとした。pEUbluntをSmaIおよびSfiIで切断し、上記JSP-1断片とライゲーションした。得られたプラスミドをN-His-JSP-1 (1-163) / pEUとした。

[0045] (ii) GFP / pEU

緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードするDNA配列が含まれるプラスミド(Plasmid-pCaMV35S-sGFP(S65T)-NOS3'(25)、Haas, J. et al., Curr. Biol., 6(3), 315-324(1996))を鋳型として、配列番号4および5に記載の塩基配列を有するプライマーを用いてPCRを行った。増幅されたDNA断片をSfiIで切断し、pEUbluntをSmaIおよびSfiIで切断したものとライゲーションを行った。得られたプラスミドをGFP /

pEUとした。

[0046] (2) タンパク質合成

上記(1)で調製したGFP/pEU、N-His-JSP-1(1-163)/pEUを鋳型として、SP6 RNA polymerase (Promega社製)を用いて転写を行い、得られたRNAをエタノール沈殿により定法に従い精製して用いた。

実施例2で調整した2種類のコムギ胚芽抽出液40 μ lに対して上記mRNAをそれぞれ2.0mg/mlの濃度で含む翻訳反応溶液(30mM HEPES-KOH, pH7.8、100mM酢酸カリウム、2.65mM酢酸マグネシウム、2.5mMジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mMクレアチンリン酸、0.4mg/mlクレアチンキナーゼ、0.380mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸(各0.3mM)20 μ l)を調製した。

[0047] この翻訳反応溶液を透析膜に入れ、Buffer(30mM HEPES-KOH, pH7.8、100mM酢酸カリウム、2.65mM酢酸マグネシウム、2.5mMジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mMクレアチンリン酸、0.380mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸(各0.3mM)2.5ml)を透析外液として用い、26℃で24時間タンパク質合成反応を行った。

[0048] 反応後のタンパク質合成溶液:1 μ lをSDS-PAGEにより分離し、CBB染色して合成物を確認した。この結果を図1に示す。図中レーン1はマーカーを示し、レーン2はコントロールのクレアチンキナーゼ、レーン3は未処理抽出液を用いてN-His-JSP-1を合成した反応液、レーン4はTalonカラム処理抽出液を用いてN-His-JSP-1を合成した反応液、レーン5は未処理抽出液を用いてGFPを合成した反応液、レーン6はTalonカラム処理抽出液を用いてGFPを合成した反応液の結果を示す。図から明かなように、Talon Metal Affinity Resinカラムで処理を行ったコムギ胚芽抽出液は、未処理のコムギ胚芽抽出液と比べて著しく低い合成能は示さず、ほぼ同等であった。

[0049] 実施例4 Talon Metal Affinity Resinによる精製比較

(1) Talon Metal Affinity Resinカラムによるタンパク質合成反応液の精製

実施例2(1)と同様に平衡化を行ったTalon Metal Affinity Resinに対して、

実施例3(2)でN-His-JSP-1(1-163)のmRNAを鋳型として、Talonカラム処理抽出液と未処理抽出液を用いて合成反応を行った反応溶液を、それぞれ50 μ l添加し、4°C、60minインキュベートし、タンパク質合成反応溶液のTalon Metal Affinity Resinへの吸着を行った。その後、3000rpm、1min、4°Cで遠心分離した。その後、Wash Buffer(HEPES-KOH(pH7.8)30mM、塩化ナトリウム300mM、グリセロール10%、イミダゾール10mM及び β メルカプトエタノール2mM):500 μ lを添加して、3000rpm、1min、4°Cで遠心分離し、Bufferを除去した。これを3回繰り返して、Talon Metal Affinity Resinへ非特異的に吸着しているタンパク質等の洗浄を行った。洗浄を行った上記カラム担体に対してElution Buffer(HEPES-KOH(pH7.8)30mM、塩化ナトリウム300mM、グリセロール10%、イミダゾール400mM及び β メルカプトエタノール2mM)50 μ lを添加し、4°C、10minインキュベートし、Talon Metal Affinity Resinに吸着したタンパク質の溶離を行った。

[0050] 上記溶離液:1 μ lをSDS-PAGEで分離し、これをCBB染色して、各タンパク質の精製度を確認した。この結果を図2に示す。図中、レーン1は分子量マーカー、レーン2はコントロールのクレアチンキナーゼ、レーン3は未処理抽出液を用いてタンパク質合成を行った後に、Talon Metal Affinity Resinカラムを用いて精製を行った結果を示し、レーン4はTalonカラム処理抽出液を用いてタンパク質合成を行った後に、同じカラムを用いて精製を行った結果を示す。

[0051] これらの結果が示すように、Talonカラム処理抽出液を用いて合成したタンパク質をTalon Metal Affinity Resinカラムで精製した場合には、目的のタンパク質だけの状態になっており、未処理抽出液を用いて合成したタンパク質をTalon Metal Affinity Resinカラムで精製した結果では、溶離液中に目的のタンパク質以外にコムギ胚芽抽出液由来のタンパク質が含まれていることがわかった。つまり、Talonカラム処理抽出液を用いて合成したタンパク質をTalon Metal Affinity Resinカラムで精製することにより、目的タンパク質の非常に高度な精製が可能であることが確認された。

[0052] 実施例5 Ni-NTAカラムによるコムギ胚芽抽出液処理
(1)Ni-NTAカラムの平衡化

金属キレートカラム担体であるNi-NTA 50%溶液(QIAGEN社製):100 μ lをスピナカラムに添加して、3000rpm、1min、4°Cで遠心分離し、カラム担体に含まれる保存Bufferを除去した。次に保存Bufferを除去した担体に、コムギ胚芽抽出液を作製する際に使用するBuffer(HEPES-KOH(pH7.8)40mM、酢酸カリウム100mM、酢酸マグネシウム5mM、L型アミノ酸20種類各0.3mM及びジチオスレイトール1mM、イミダゾール10mM):500 μ lを添加して、3000rpm、1min、4°Cで遠心分離し、Bufferを除去した。これを3回繰り返す、担体の平衡化を行った。

[0053] (2) Ni-NTAカラムによるコムギ胚芽抽出液処理

上記(1)で平衡化を行ったカラム担体に対して、実施例1で作製したコムギ胚芽抽出液:50 μ lにイミダゾール10mMを添加したものをアプライし、4°C、30minインキュベートし、コムギ胚芽抽出液に内在性のNi-NTAカラムに吸着するタンパク質の吸着を行った。その後、3000rpm、1min、4°Cで遠心分離し、内在性のNi-NTAカラムに吸着するタンパク質を除去したコムギ胚芽抽出液(以下、これを「Ni-NTAカラム処理抽出液」と称することがある)を作製した。

[0054] (3) Ni-NTAカラム処理抽出液と未処理抽出液の液組成調整

上記の条件で処理を行ったNi-NTAカラム処理抽出液と実施例1で作製した未処理抽出液の液組成を最終濃度 30mM HEPES-KOH, pH7.8、100mM酢酸カリウム、2.65mM酢酸マグネシウム、2.5mMジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mMクレアチンリン酸、0.4mg/mlクレアチンキナーゼ、0.380mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸(各0.3mM)になるように調整した。その後液組成を調整したコムギ胚芽抽出液を260nmでの吸光度が75AbsになるようにBuffer(30mM HEPES-KOH, pH7.8、100mM酢酸カリウム、2.65mM酢酸マグネシウム、2.5mMジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mMクレアチンリン酸、0.6mg/mlクレアチンキナーゼ、0.380mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸(各0.3mM))を用いて調節した。

[0055] 実施例6 Ni-NTAカラム処理抽出液と未処理抽出液のタンパク質合成能の比較

実施例5で調整した2種類のコムギ胚芽抽出液40 μ lに対して(i) Protein Kinase 65の遺伝子(配列番号6)とその下流にとヒスチジン10個が付加した遺伝子配列をコ

ードするmRNA (ii) Protein Kinase 142の構造遺伝子(ヘッリクスクローン)とその下流にとヒスチジン10個が付加した遺伝子配列をコードするmRNAの2種類を用いてタンパク質合成を行った。

[0056] (1) 鑄型の調製

(i) Protein Kinase 65-CHIS/pEU

Protein Kinase 65(配列番号6)を鑄型として、5'センス側のプライマーとして、Protein Kinase 65の5'端の配列を含むオリゴDNA(配列番号7)用い、3'アンチセンス側プライマーとして、5'末端にSfi Iサイトを付加し、ヒスチジントグをコードする配列を付加し終止コドンを含まないProtein Kinase 65を増幅することができるオリゴDNA(配列番号8)を用いてPCRによりDNA断片を増幅した。得られたDNA断片をSfi Iで切断した(以下、これを「PK65断片」と称することがある)。実施例3(1)(i)に記載のpEUbluntをSmaIおよびSfi Iで切断し、上記PK65断片とライゲーションした。得られたプラスミドをProtein Kinase 65-CHIS/pEUとした。

[0057] (ii) Protein Kinase 142-CHIS/pEU

Protein Kinase 142(配列番号9)を鑄型として、5'センス側のプライマーとして、さらにその下流にProtein Kinase 142の5'端の配列を含むオリゴDNA(配列番号10)用い、3'アンチセンス側プライマーとして、5'末端にSfi Iサイトを付加し、ヒスチジントグをコードする配列を付加し終止コドンを含まないProtein Kinase 142を増幅することができるオリゴDNA(配列番号11)を用いてPCRによりDNA断片を増幅した。得られたDNA断片をSfi Iで切断した(以下、これを「PK142断片」と称することがある)。

実施例3(1)(i)に記載のpEUbluntをSmaIおよびSfiIで切断し、上記PK142断片とライゲーションした。得られたプラスミドをProtein Kinase 142-CHIS/pEUとした。

[0058] (2) タンパク質合成

上記(1)で調製したProtein Kinase 142-CHIS/pEU、Protein Kinase 65-CHIS/pEUを鑄型として、SP6 RNA polymerase(Promega社製)を用いて転写を行い、得られたRNAをエタノール沈殿により定法に従い精製して用いた。

実施例5で調整した2種類のコムギ胚芽抽出液40 μ lに対して、上記mRNAをそれぞれ2.0mg/mlの濃度で含む翻訳反応溶液(30mM HEPES-KOH, pH7.8、100mM酢酸カリウム、2.65mM酢酸マグネシウム、2.5mMジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mMクレアチンリン酸、0.6mg/mlクレアチンキナーゼ、0.380mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸(各0.3mM)20 μ l)を調製した。

- [0059] この翻訳反応溶液を透析膜に入れ、Buffer(30mM HEPES-KOH, pH7.8、100mM酢酸カリウム、2.65mM酢酸マグネシウム、2.5mMジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mMクレアチンリン酸、0.380mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸(各0.3mM)2.5ml)を透析外液として用い、26°Cで24時間タンパク質合成反応を行った。

これらの各タンパク質合成反応溶液中に含まれる目的タンパク質量を、実施例3(2)に記載の方法で比較したところ、Ni-NTAカラム処理抽出液のタンパク質合成能は、未処理抽出液と比べてほぼ同等であった。

- [0060] 実施例7 各タンパク質合成反応溶液のNi-NTAカラムによる精製比較

(1) Ni-NTAカラムによるタンパク質合成反応溶液の精製

実施例5(1)と同様に平衡化を行なったNi-NTAカラムに対して、実施例6(2)で、Protein Kinase 65-CHIS、およびProtein Kinase 142-CHISのmRNAを鋳型として、Ni-NTAカラム処理抽出液を用いて合成反応を行った反応溶液、および未処理抽出液を用いて合成反応を行った反応溶液を、それぞれ50 μ l添加し、4°C、60minインキュベートし、タンパク質合成反応溶液のNi-NTAカラムへの吸着を行った。その後、3000rpm、1min、4°Cで遠心分離した。その後、Wash Buffer(HEPES-KOH(pH7.8)30mM、塩化ナトリウム300mM、グリセロール10%、イミダゾール10mM及びジチオスレイトール1mM):500 μ lを添加して、3000rpm、1min、4°Cで遠心分離し、Bufferを除去した。これを3回繰り返し、担体への非特異的に吸着しているタンパク質等の洗浄を行った。洗浄を行った上記カラム担体に対してElution Buffer(HEPES-KOH(pH7.8)30mM、塩化ナトリウム300mM、グリセロール10%、イミダゾール200mM及びジチオスレイトール1mM)50 μ lを添加し、4°C、10

minインキュベートし、Ni-NTAカラムに吸着したタンパク質の溶離を行った。

[0061] 上記溶離液:1 μ lをSDS-PAGEで分離し、これをCBB染色して、各タンパク質の精製度を確認した。この結果を図3に示す。図中、レーン1は未処理抽出液を用いてPK65の合成を行った後に、Ni-NTAカラムを用いて精製を行った結果を示し、レーン2はNi-NTAカラム処理抽出液を用いてPK65の合成を行った後に、同じNi-NTAカラムを用いて精製を行った結果を示し、レーン3は未処理抽出液を用いてPK142の合成を行った後に、同じNi-NTAカラムを用いて精製を行った結果を示し、さらにレーン4はNi-NTA処理抽出液を用いてPK142の合成を行った後に、同じNi-NTAカラムを用いて精製を行った結果を示す。

[0062] これらの結果が示すように、Ni-NTAカラム処理抽出液を用いて合成したタンパク質をNi-NTAカラムで精製した結果では、溶離液中の目的のタンパク質の純度が高くなっており、未処理抽出液を用いて合成したタンパク質をNi-NTAカラムで精製した結果では、目的のタンパク質以外にコムギ胚芽抽出液由来のタンパク質が高濃度溶離液中に含まれていることがわかった。つまり、Ni-NTAカラム処理抽出液を用いて合成したタンパク質をNi-NTAカラムで精製することにより、目的タンパク質の非常に高度な精製が可能であることが確認された。

[0063] 実施例8 グルタチオン結合担体によるコムギ胚芽抽出液処理

(1) グルタチオン結合担体カラムの平衡化

グルタチオン結合担体であるMicroSpin GST Purification Module (アマシャムバイオサイエンス社製):50 μ lを使用して、3000rpm、1min、4°Cで遠心分離し、カラム担体に含まれる保存Bufferを除去した。次に保存Bufferを除去した担体にコムギ胚芽抽出液を作製する際に使用するBuffer (HEPES-KOH (pH7.8) 40mM、酢酸カリウム100mM、酢酸マグネシウム5mM、L型アミノ酸20種類各0.3mM及びジチオスレイトール2.5mM):500 μ lを添加して、3000rpm、1min、4°Cで遠心分離し、Bufferを除去した。これを3回繰り返す、担体の平衡化を行った。

[0064] (2) グルタチオン結合担体カラムによるコムギ胚芽抽出液処理

上記(1)で平衡化を行ったカラム担体に対して実施例1で作製したコムギ胚芽抽出液:50 μ lを添加し、4°C、30minインキュベートし、コムギ胚芽抽出液に内在性のグ

グルタチオン結合担体カラム吸着するタンパク質の吸着を行った。その後、3000rpm、1min、4℃で遠心分離し、内在性のグルタチオン結合担体カラムに吸着するタンパク質除去したコムギ胚芽抽出液(以下、これを「グルタチオン結合担体処理抽出液」と称することがある)を作製した。

[0065] (3)グルタチオン結合担体処理抽出液と未処理抽出液の液組成調整

上記の条件で処理を行ったグルタチオン結合担体処理抽出液と実施例1で作製した未処理抽出液組成を最終濃度 30mM HEPES-KOH, pH7. 8、100mM酢酸カリウム、2. 65mM酢酸マグネシウム、2. 5mMジチオスレイトール、1. 2mM ATP、0. 25mM GTP、16mMクレアチンリン酸、0. 4mg/mlクレアチンキナーゼ、0. 380mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸(各0. 3mM)になるように調整した。その後、液組成を調整したコムギ胚芽抽出液を260nmでの吸光度が75AbsになるようにBuffer (30mM HEPES-KOH, pH7. 8、100mM酢酸カリウム、2. 65mM酢酸マグネシウム、2. 5mMジチオスレイトール、1. 2mM ATP、0. 25mM GTP、16mMクレアチンリン酸、0. 4mg/mlクレアチンキナーゼ、0. 380mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸(各0. 3mM))を用いて調節した。

[0066] 実施例9 グルタチオン結合担体処理抽出液と未処理抽出液のタンパク質合成能の比較

実施例8で調整した2種類のコムギ胚芽抽出液40 μ lに対して(i) GFPの構造遺伝子とその上流にとGSTが付加した遺伝子配列をコードするmRNAを用いてタンパク質合成を行った。

(1) 鋳型の調製

(i) NGST-GFP/pEU

GST(配列番号12)を鋳型として、5'センス側のプライマーとして、GSTの5'端の配列を含むオリゴDNA(配列番号 13)用い、3'アンチセンス側プライマーとして、5'末端にGFPの5'末端とアニリングする配列を付加し、終止コドンを含まないGSTを増幅することができるオリゴDNA(配列番号14)を用いてPCRによりDNA断片を増幅した。得られたDNA断片と実験例3で作成したGFP断片を鋳型として5'センス側のプライマーとして、GSTの5'端の配列を含むオリゴDNA(配列番号13)と3'アン

チセンス側プライマーとして、5' 端sfiIの配列を付加した

GFPの3' 端の配列を含むオリゴDNA (配列番号5)を用いてPCRによりDNA断片を増幅し、得られたDNA断片をSfiIで切断した(以下、これを「GST-GFP断片」と称することがある)。実施例3(1)(i)に記載のpEUbluntをSma IおよびSfi Iで切断し、上記GST-GFP断片とライゲーションした。得られたプラスミドをNGST-GFP/pEUとした。

[0067] (2)タンパク質合成

上記(1)で調製したNGST-GFP/pEUを鋳型として、SP6 RNA polymerase (Promega社製)を用いて転写を行い、得られたRNAをエタノール沈殿により定法に従い精製して用いた。

実施例8で調整した2種類のコムギ胚芽抽出液40 μ lに対して、上記mRNAをそれぞれ2.0mg/mlの濃度で含む翻訳反応溶液(30mM HEPES-KOH, pH7.8、100mM酢酸カリウム、2.65mM酢酸マグネシウム、2.5mMジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mMクレアチンリン酸、0.4mg/mlクレアチンキナーゼ、0.380mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸(各0.3mM)20 μ l)を調製した。

[0068] この翻訳反応溶液を透析膜に入れ、Buffer(30mM HEPES-KOH, pH7.8、100mM酢酸カリウム、2.65mM酢酸マグネシウム、2.5mMジチオスレイトール、1.2mM ATP、0.25mM GTP、16mMクレアチンリン酸、0.380mMスペルミジン、20種類のL型アミノ酸(各0.3mM)2.5ml)を透析外液として用い、26℃で24時間タンパク質合成反応を行った。

これらの各タンパク質合成反応溶液中に含まれる目的タンパク質量を、実施例3(2)に記載の方法で比較したところ、グルタチオン結合担体処理抽出液のタンパク質合成能は、未処理抽出液と比べてほぼ同等であった。

[0069] 実施例10 タンパク質合成反応溶液のグルタチオン結合担体カラムによる精製比較
(1) グルタチオン結合担体カラムによるタンパク質合成反応溶液の精製

実施例8(1)と同様に平衡化を行なったグルタチオン結合担体カラムに対して、実施例9(2)で、GST-GFPのmRNAを鋳型として、グルタチオン結合担体処理抽出

液を用いて合成反応を行った反応溶液、および未処理抽出液を用いて合成反応を行った反応溶液を、それぞれ50 μ l添加し、MicroSpin GST Purification Module(アマシャムバイオサイエンス社製)のプロトコルに従って担体への吸着を行った。その後、MicroSpin GST Purification Module(アマシャムバイオサイエンス社製)のプロトコルに従って、担体への非特異に吸着しているタンパク質等の洗浄、および溶離を行った。

- [0070] 上記溶離液:5 μ lをSDS-PAGEで分離し、これをCBB染色して、目的タンパク質の精製度を確認した。この結果、グルタチオン結合担体処理抽出液を用いて合成したタンパク質を、同じグルタチオン結合担体カラムにより精製した結果では、未処理抽出液を用いて合成した場合と比べて目的のタンパク質の純度が若干高くなっていた。未処理抽出液を用いて合成した目的タンパク質を、同じグルタチオン結合担体カラムにより精製した結果では、目的タンパク質以外にコムギ胚芽抽出液由来のタンパク質が、溶離液中に若干含まれていることがわかった。

産業上の利用の可能性

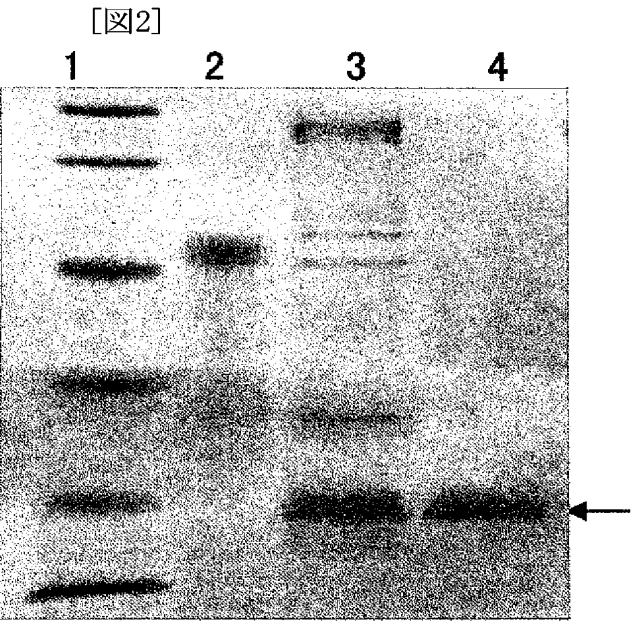
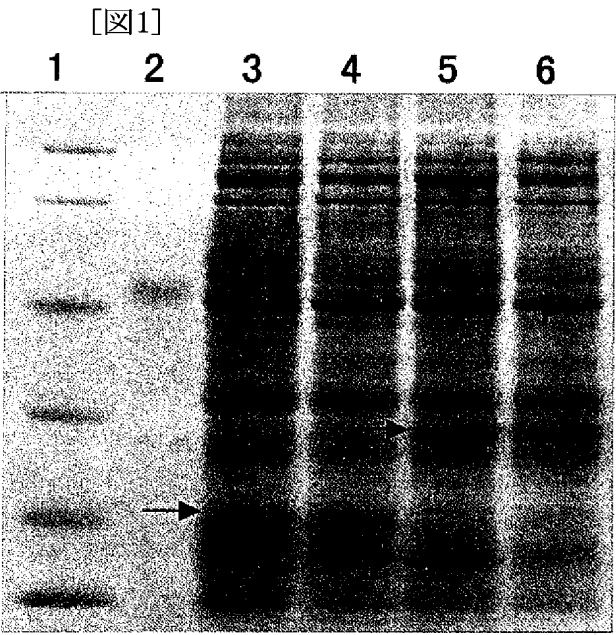
- [0071] 本発明によって改良された無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いてタンパク質合成を行い、得られたタンパク質を細胞抽出液を製造する際に用いたアフィニティ担体を用いて精製することにより、高度に精製された目的タンパク質を取得することができる。この方法によれば、アフィニティ担体カラムのベッドボリュームを小さくすることができるため、目的タンパク質の濃縮も可能となり、無細胞タンパク質合成系において合成量が少ないタンパク質の回収にも、非常に有益である。さらに、高度に精製されたタンパク質を必要とするタンパク質立体構造解析やタンパク質機能解析等にも高純度の目的タンパク質を大量に供給することが可能となった。

また、本発明によって改良された無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いてタンパク質合成を行い、得られたタンパク質を、細胞抽出液を製造する際に用いたアフィニティ担体と実質的に同一のものと接触させて、該アフィニティ担体に保持された物質と親和性を有し、結合するタンパク質の選択、つまりタンパク質-物質間相互作用解析を行なう場合、擬陽性の割合を非常に低下させることができ、より高効率な相互作用解析を行なうことができる。

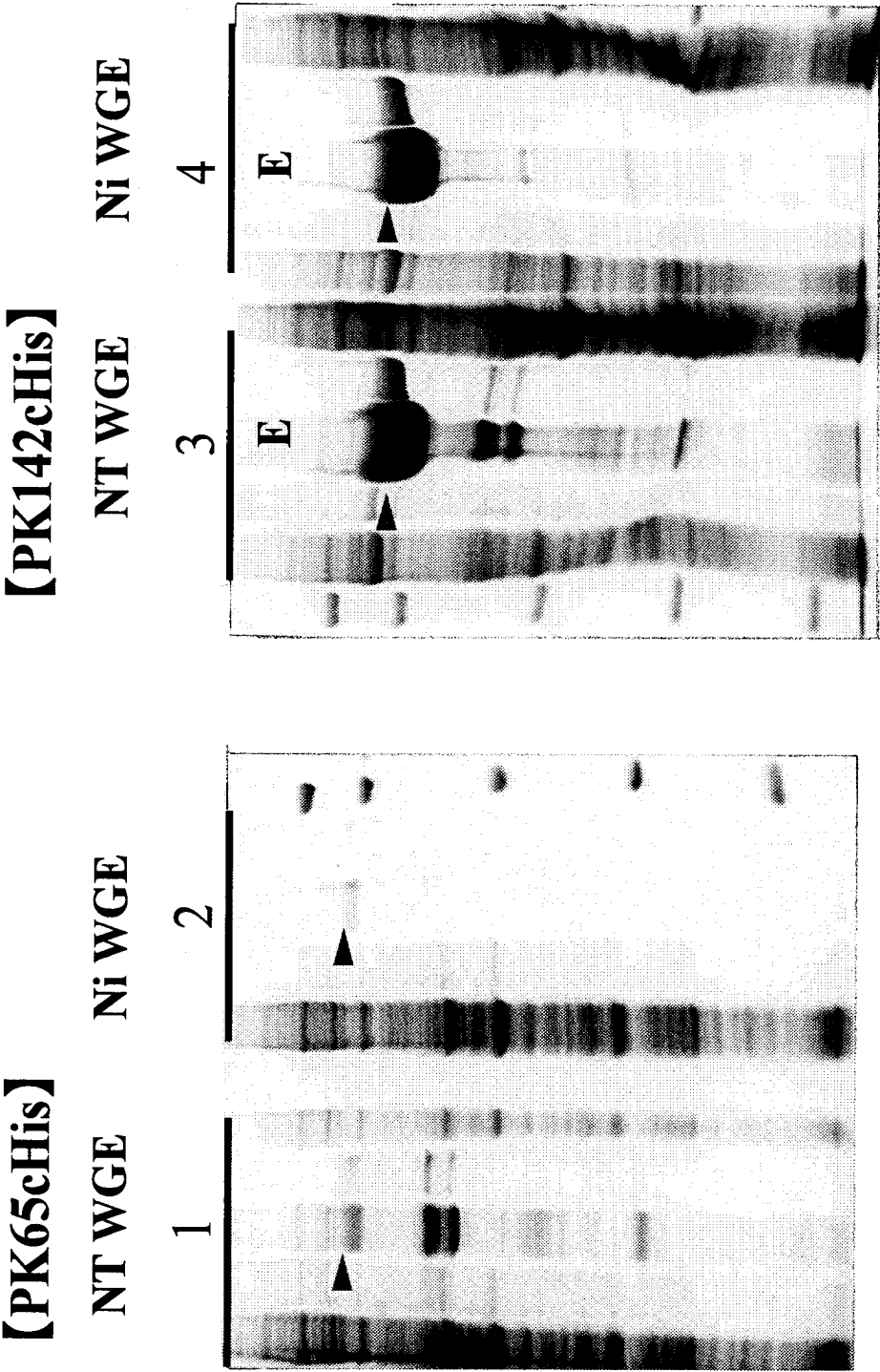
請求の範囲

- [1] 無細胞タンパク質合成用細胞抽出液製造法であって、タンパク質合成活性を有する細胞抽出液を該抽出液を用いて合成されるタンパク質に親和性を有するアフィニティ担体と接触させて、該細胞抽出液から該アフィニティ担体に結合する物質を除去する工程を含み、該アフィニティ担体は、該細胞抽出液に接触させても該細胞抽出液のタンパク質合成能を損なわないアフィニティ担体であることを特徴とする方法。
- [2] 細胞抽出液が、コムギ胚芽抽出液であることを特徴とする請求項1に記載の方法。
- [3] アフィニティ担体が、請求項1または2に記載の方法で製造された無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いて合成されるタンパク質が結合し得る物質を担持しているものである請求項1または2に記載の方法。
- [4] アフィニティ担体が、金属キレート担体であることを特徴とする請求項1〜3のいずれか1項に記載の方法。
- [5] 金属キレート担体が、コバルト担体、ニッケル担体、あるいは亜鉛キレート担体のいずれかである請求項4に記載の方法。
- [6] 請求項1〜5のいずれか1項に記載の方法により製造された無細胞タンパク質合成用細胞抽出液。
- [7] 無細胞タンパク質合成用細胞抽出液であって、該抽出液を用いて合成されるタンパク質に親和性を有するアフィニティ担体に結合し、該細胞抽出液のタンパク質合成能に大きく影響しない物質が除去されていることを特徴とする細胞抽出液。
- [8] 請求項6または7に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いてタンパク質を合成するタンパク質製造方法。
- [9] 請求項6または7に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いてタンパク質の合成反応を行い、得られた合成反応液を、該細胞抽出液の製造に用いたアフィニティ担体、又はこれと実質的に同一のアフィニティ担体と接触させることにより、該タンパク質を該アフィニティ担体に結合させて回収することを特徴とするタンパク質の精製方法。
- [10] 請求項6または7に記載の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を用いてタンパク質の合成反応を行い、得られた合成反応液を、該細胞抽出液の製造に用いたアフィニ

ティ担体またはこれと実質的に同一のアフィニティ担体であって目的物質が担持されたアフィニティ担体と接触させることにより、該タンパク質と該目的物質の相互作用を解析することを特徴とするタンパク質－物質間相互作用解析方法。



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003508

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ C12P21/00, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12P21/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JP 7-203984 A (Yaeta ENDO), 08 August, 1995 (08.08.95), Full text (Family: none)	<u>6-8</u> 1-5, 9, 10
<u>X</u> A	JP 5-236986 A (Nippon Sanso Corp.), 17 September, 1993 (17.09.93), Full text (Family: none)	<u>6-8</u> 1-5, 9, 10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 March, 2005 (24.03.05)

Date of mailing of the international search report
12 April, 2005 (12.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P21/00, C12N15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P21/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	JP 7-203984 A (遠藤 弥重太) 1995.08.08, 全文 (ファミリーなし)	<u>6-8</u> 1-5, 9, 10
<u>X</u> A	JP 5-236986 A (日本酸素株式会社) 1993.09.17, 全文 (ファミリーなし)	<u>6-8</u> 1-5, 9, 10

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24.03.2005

国際調査報告の発送日

12.4.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4B

3227

電話番号 03-3581-1101 内線 3488